



TITLE:

Development of efficient amplification method of DNA hydrogel and composite-type DNA hydrogel for photothermal immunotherapy( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Yata, Tomoya

---

CITATION:

Yata, Tomoya. Development of efficient amplification method of DNA hydrogel and composite-type DNA hydrogel for photothermal immunotherapy. 京都大学, 2016, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19668>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2018-03-31に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（薬科学）	氏名	矢田 智也
論文題目	Development of efficient amplification method of DNA hydrogel and composite-type DNA hydrogel for photothermal immunotherapy (DNAハイドロゲルの効率的増幅法および光熱免疫療法のための複合材料型DNAハイドロゲルの開発に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA ナノテクノロジーは、DNA の二本鎖形成能を巧みに利用して複雑な微小構造を構築する、近年急速に発展した新しいナノテクノロジーである。病態情報薬学分野ではこれまでに、DNA ナノテクノロジーの疾患治療システムへの応用に関する研究を行い、多足型 DNA 構造体（polypod-like structured DNA: polypodna）を基盤として自己組織化によりゲル化する DNA ハイドロゲルを開発してきた。さらに、配列中に Toll-like receptor 9 のリガンドである CpG motif を挿入することで、自然免疫の活性化および内包した抗原や抗がん剤の徐放化により高い抗腫瘍効果が得られることも見出した。申請者は、polypodna を基盤とする DNA ハイドロゲルの生物医学的応用の加速を目的に、合成コスト低減のための効率的増幅法の開発、ならびに光熱免疫療法のための複合材料型 DNA ハイドロゲル製剤の開発を試みた。</p>			
第一章 自己ゲル化多足型 DNA 構造体の効率的増幅法の開発			
<p>Polypodna をはじめとする DNA ナノ構造体は、通常、化学合成されたオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）で構成されるため、その応用に際しては合成コストが問題となる。そこで第一章では、合成コストの低減を目的に酵素反応を用いた polypodna の効率的増幅法の開発を試みた。増幅方法として、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いたローリングサークル型増幅（RCA）法を、増幅した長鎖 DNA からの polypodna の切り出しには制限酵素 TspRI による消化を選択し、生成した polypodna が 9 塩基の粘着末端を持つように設計した。検証には足の本数が 3 本（tripodna）または 4 本（tetrapodna）の 2 種類の polypodna を選択した。ループ状にデザインした polypodna の配列と TspRI 認識配列を直列に配置した DNA を設計し、T4 DNA リガーゼを用いて環状化した。これを鋳型として RCA 反応を行った結果、粘性の高い RCA 生成物が得られた。RCA 生成物中に含まれるピロリン酸マグネシウムを EDTA で分解し、TspRI で制限酵素消化したところ、生成物は自発的にゲル化した。走査型電子顕微鏡観察により、化学合成 ODN で作製した DNA ハイドロゲルと同様の内部構造であること、また原子間力顕微鏡観察により、その構成ユニットが 3 または 4 分岐の多足型であることが確認された。以上、RCA と制限酵素を用いて自己ゲル化する DNA ハイドロゲルの効率的増幅法の開発に成功した。</p>			
第二章 光熱免疫療法のための複合材料型 DNA ハイドロゲルの開発			
<p>光熱免疫療法は、光熱効果による局所的ながん細胞の焼灼と全身性の免疫活性化</p>			

を組み合わせたがんの新たな治療法である。その治療効果を最大限に引き出すには、光熱活性および自然免疫を活性化する機能を併せ持つ製剤の開発が必要である。そこで、光熱効果の標的化を目的に高い投与部位滞留性が期待できる新規のハイドロゲル製剤の開発を試みた。免疫刺激性の DNA ハイドロゲルは CpG motif を含む hexapodna（6 本足の polypodna）で設計し、光熱剤には金ナノ粒子（AuNP）を選択した。AuNP と結合する poly A 配列を含む ODN で金ナノ粒子表面を修飾し、この ODN 末端と相補的な末端配列を配した hexapodna を別途作製し、自己ゲル化技術に基づき両者を混合することで AuNP-DNA ハイドロゲルを得た。AuNP-DNA ハイドロゲルは、波長 532 nm のレーザー照射により発熱して崩壊し、放出物はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞またはマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞からの炎症性サイトカイン産生を促進した。ゲル電気泳動の結果、レーザー照射により AuNP-DNA ハイドロゲルから高次構造を維持した hexapodna が放出されることが示唆された。*In vivo* への適用には生体組織透過性の高い波長 780 nm の近赤外線レーザーを利用することとし、光熱剤を AuNP から金ナノロッド（AuNR）に変換した AuNR-DNA ハイドロゲルを開発した。マウスリンパ腫細胞株 EG7 細胞を背部皮下に担がんしたマウスに対し、近赤外線レーザーを腫瘍局所に照射した。その結果、AuNR-DNA ハイドロゲル投与群において、熱ショックタンパク質の mRNA 発現の亢進および脾臓細胞の腫瘍抗原に応答したサイトカイン産生、腫瘍増殖の抑制、生存率の延長が認められた。

以上、申請者は、DNA ハイドロゲルの合成コストの問題を解決可能な新たな方法論を提示するとともに、光熱免疫療法に利用可能な高機能型 DNA ハイドロゲル製剤の開発に成功した。本研究の成果は、polypodna を基盤とする DNA ハイドロゲルの生物医学的応用を加速するものと考ええる。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、多足型 DNA 構造体 (polypod-like structured DNA: polypodna) を基盤とする DNA ハイドロゲルの生物医学的応用の加速を目的に、以下の二章に渡り、合成コスト低減のための効率的増幅法の開発、ならびに光熱免疫療法のための複合材料型 DNA ハイドロゲル製剤の開発を試みた。

## 第一章 自己ゲル化多足型 DNA 構造体の効率的増幅法の開発

申請者は、合成コストの低減を目的に酵素反応を用いた polypodna の効率的増幅法の開発を試みた。増幅方法として、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いたローリングサークル型増幅 (RCA) 法を、増幅した長鎖 DNA からの polypodna の切り出しには制限酵素 TspRI による消化を選択し、生成した polypodna が 9 塩基の粘着末端を持つように設計した。検証には足の本数が 3 本 (tripodna) または 4 本 (tetrapodna) の 2 種類の polypodna を選択した。ループ状にデザインした polypodna の配列と TspRI 認識配列を直列に配置した DNA を設計し、T4 DNA リガーゼを用いて環状化した。これを鋳型として RCA 反応を行った結果、粘性の高い RCA 生成物が得られた。RCA 生成物中に含まれるピロリン酸マグネシウムを EDTA で分解し、TspRI で制限酵素消化したところ、生成物は自発的にゲル化した。走査型電子顕微鏡観察により、化学合成オリゴデオキシヌクレオチドで作製した DNA ハイドロゲルと同様の内部構造であること、また原子間力顕微鏡観察により、その構成ユニットが 3 または 4 分岐の多足型であることが確認された。以上、RCA と制限酵素を用いて自己ゲル化する DNA ハイドロゲルの効率的増幅法の開発に成功した。

## 第二章 光熱免疫療法のための複合材料型 DNA ハイドロゲルの開発

申請者は、光熱免疫療法における光熱効果の標的化を目的に高い投与部位滞留性が期待できる新規のハイドロゲル製剤の開発を試みた。免疫刺激性の DNA ハイドロゲルは CpG motif を含む hexapodna (6 本足の polypodna) で設計し、光熱剤には金ナノ粒子 (AuNP) を選択した。AuNP と結合する poly A 配列を含む ODN で金ナノ粒子表面を修飾し、この ODN 末端と相補的な末端配列を配した hexapodna を別途作製し、自己ゲル化技術に基づき両者を混合することで AuNP-DNA ハイドロゲルを得た。AuNP-DNA ハイドロゲルは、波長 532 nm のレーザー照射により発熱して崩壊し、放出物はマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞またはマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞からの炎症性サイトカイン産生を促進した。ゲル電気泳動の結果、レーザー照射により AuNP-DNA ハイドロゲルから高次構造を維持した hexapodna が放出されることが示唆された。In vivo への適用には生体組織透過性の高い波長 780 nm の近赤外線レーザーを利用することとし、光熱剤を AuNP から金ナノロッド (AuNR) に変換した AuNR-DNA ハイドロゲルを開発した。マウスリンパ腫細胞株 EG7 細胞を背部皮下に担がんしたマウスに対し、近赤外線レーザーを腫瘍局所に照射した。その結果、AuNR-DNA ハイドロゲル投与群において、熱ショックタンパク質の mRNA 発現の亢進および脾臓細胞の腫瘍抗原に応答したサイトカイン産生、腫瘍増殖の抑制、生存率の延長が認められた。

以上、申請者は、DNA ハイドロゲルの合成コストの問題を解決可能な新たな方法論を提示するとともに、光熱免疫療法に利用可能な高機能型 DNA ハイドロゲル製剤の開発に成功した。本研究の成果は、polypodna を基盤とする DNA ハイドロゲルの生物医学的応用を加速するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降